

Rastermikroskop

- Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop mit einem Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs, mit einem
- 5 Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, mit zumindest einem Objektiv zum Fokussieren des Anregungslichtstrahls und des Stimulationslichtstrahls und mit einem optischen Bauteil zur Beeinflussung der Form des Fokus des
- 10 Anregungslichtstrahls und/oder des Stimulationslichtstrahls.

In der Rastermikroskopie (Scannmikroskopie) wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus des Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch

15 Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x- und der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkippung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichts wird in Abhängigkeit von der

20 Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung

ausgerüstet. Neben diesen sogenannten strahlscannenden Methoden sind auch Scanmikroskope mit räumlich feststehendem Beleuchtungslichtstrahl bekannt, bei denen die Probe zur Abtastung mit Hilfe eines Feinpositioniertisches verfahren wird. Diese Scanmikroskope werden 5 objektscannend genannt.

Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.

Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die 10 sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht 15 gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch 20 sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatenaufnahme erzielt.

Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für 25 Fluoreszenzanwendungen ist aus der DE 44 16 558 bekannt. Hierbei werden die lateralen Randbereiche des Fokusvolumens des Anregungslichtstrahls mit einem Lichtstrahl einer anderen Wellenlänge, dem sog. Stimulationslichtstrahl, der von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert wird dann nur das spontan emittierte Licht aus 30 den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so dass insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.

Beispielsweise aus US 2002/0167724 A1 oder aus US 6,667,830 B1 ist eine Variante der STED-Technik bekannt, bei der die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche mit dem Licht des zweiten Lasers zunächst weiter – nämlich in einen dritten Zustand – angeregt werden. Bei dieser Variante, für 5 die sich auch der Begriff „up-conversion“ eingebürgert hat, wird äquivalent zu der Variante der direkten stimulierten Abregung in den Grundzustand eine Auflösungssteigerung erzielt.

Aus DE 100 12 462 A1 ist eine Vorrichtung zur Beleuchtung eines Objekts vorzugsweise bei der konfokalen Fluoreszenzrastermikroskopie mit einem 10 Beleuchtungsstrahlengang einer Lichtquelle und mindestens einem weiteren Beleuchtungsstrahlengang einer weiteren Lichtquelle, wobei die Beleuchtungsstrahlengänge zumindest teilweise einander überlagerbar sind, bekannt. Die Vorrichtung ist zur Vereinfachung der Justierung sowie zur Reduktion der optischen Bauteile im Beleuchtungsstrahlengang dadurch 15 gekennzeichnet, dass mindestens in einem der Beleuchtungsstrahlengänge mindestens ein optisches Bauteil angeordnet ist, wobei die optischen Eigenschaften des Bauteils derart beeinflussbar bzw. veränderbar sind, dass sich das Beleuchtungsmuster des Beleuchtungsstrahlengangs im Objektbereich in seiner Form verändert. Das optische Bauteil kann hierbei 20 beispielsweise als runde Phasenverzögerungsplatte, die in ihrem Durchmesser kleiner als der Strahldurchmesser ist und folglich überleuchtet wird, ausgebildet sein. Als Phasenverzögerungsplatte wird ein optisches Bauteil bezeichnet, das eine ortsabhängige Phasenverzögerung des die Phasenverzögerungsplatte durchtretenden Lichts bewirkt. Die 25 Phasenverzögerungsplatte ist im Strahlengang des eine stimulierte Emission auslösenden Beleuchtungsstrahls angeordnet und erzeugt bei geeigneter Struktur einen hohlen Fokus, der eine Auflösungsverbesserung sowohl lateral als auch axial ermöglicht. Eine bevorzugte Ausgestaltung einer Phasenverzögerungsplatte besteht aus einem Substrat, auf das lokal in 30 bestimmten Bereichen eine oder mehrere Schichten eines phasenverzögernd wirkenden Materials (beispielsweise MgF₂) aufgebracht sind. Sind die Dicken der Schichten und die Größen der Schichtbereiche so gewählt, dass die Hälfte der gesamten Lichtamplitude in der Pupille der Mikroskopoptik eine

Phasenverzögerung von $\lambda/2$ gegenüber der anderen Hälfte der Lichtamplitude besitzt, dann erzeugt die fokussierte Wellenfront im Fokus der Mikroskopoptik (Objektiv) destruktive Interferenz. Die resultierende PSF (Point Spread Function) besitzt somit ein Minimum der Fokusmitte.

- 5 Die Verwendung von Phasenverzögerungsplatten in der STED-Mikroskopie wird beispielsweise auch in den folgenden Veröffentlichungen erwähnt: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 97, p. 8206-8210, 2000; Appl. Phys. Lett., Vol. 82, No. 18, p. 3125-3127, 2003; Phys. Rev. Lett., Vol. 88, p. 163901-1 – 163901-4, 2002; Phys. Rev. E, Vol. 64, p. 066613-1 – 066613-9, 2001.

- 10 Anstelle von herkömmlichen Phasenverzögerungsplatten können auch LCDs oder programmierbare Lichtmodulatoren verwendet werden.

Eine Auflösungssteigerung in Richtung der optischen Achse lässt sich, wie in der Europäischen Patentschrift EP 0 491 289 mit dem Titel: „Doppelkonfokales Rastermikroskop“ beschrieben ist, durch eine

- 15 Doppelobjektivanordnung (4Pi-Anordnung) erreichen. Das vom Beleuchtungssystem kommende Anregungslicht wird in zwei Teilstrahlen aufgespalten, die die Probe einander entgegenlaufend durch zwei spiegelsymmetrisch angeordnete Objektive gleichzeitig beleuchten. Die beiden Objektive sind auf verschiedenen Seiten der ihnen gemeinsamen
20 Objektebene angeordnet. Im Objektpunkt bildet sich durch diese interferometrische Beleuchtung ein Interferenzmuster aus, das bei konstruktiver Interferenz ein Hauptmaximum und mehrere Nebenmaxima aufweist. Interferiert nur das Licht der Anregung, spricht man von 4Pi-Mikroskopie des Typs A, bei gleichzeitiger Interferenz des Detektionslichts von
25 Typ C. Mit diesem doppelkonfokalen Rastermikroskop kann im Vergleich zum konventionellen Rastermikroskop durch die interferometrische Beleuchtung eine erhöhte axiale Auflösung erzielt werden.

Durch eine Kombination von STED und doppelkonfokaler Anordnung lässt sich sowohl lateral, als auch axial eine Auflösungssteigerung erreichen.

- 30 In einer besonderen Kombination von einer STED- und einer doppelkonfokalen Anordnung, dem STED-4Pi-Mikroskop, wird mit Hilfe einer doppelkonfokalen Anordnung des Stimulationslichtstrahls eine destruktive

Interferenz in der Fokusmitte erzeugt. Eine stimulierte Abregung ist somit auf den axialen Fokusrand beschränkt (Phys. Rev. Lett., vol. 88, p. 163901-1 – 163901-4, 2002).

- Es hat sich gezeigt, dass zur Erzielung eines bestmöglichen
- 5 Auflösungsvermögens das optische Bauteil vorzugsweise im Strahlengang des Stimulationslichtstrahles sehr exakt positioniert und justiert werden muss. Nachteiligerweise ist aufgrund dieses Umstandes nach jedem Objektivwechsel eine aufwendige Nachjustierung und Anpassung des optischen Bauteils auf die baulichen und optischen Eigenschaften des neuen
- 10 Objektivs erforderlich.
- Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Rastermikroskop anzugeben, mit dem bei wesentlich reduziertem Justieraufwand der theoretisch mögliche Auflösungsgrad erreichbar ist, und das gleichzeitig eine vereinfachte Anpassbarkeit an wechselnde Untersuchungsbedingungen –
- 15 beispielsweise Objektivwechsel – bietet.
- Die Aufgabe wird durch ein Rastermikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Optik zum Abbilden des optischen Bauteils in die Pupille des Objektivs vorgesehen ist, wobei die Größe des Abbildes des optischen Bauteils einstellbar ist.
- 20 Die Erfindung hat den Vorteil, dass zumindest eine Optik vorgesehen ist, die das optische Bauteil in die Pupille des Objektivs abbildet, wobei die Größe des Abbildes des optischen Bauteils einstellbar ist.
- Erfindungsgemäß wurde erkannt, dass zur Erzielung einer exakten
- 25 Manipulation der Wellenfront des Anregungslichtstrahls bzw. des Stimulationslichtstrahls das optische Bauteil in der Pupille des Objektivs oder in einer dazu konjugierten Ebene angeordnet sein muss. Vorzugsweise wirkt das optische Bauteil ausschließlich auf den Stimulationslichtstrahl und nicht auf den Anregungslichtstrahl. Da der Stimulationslichtstrahl und der Anregungslichtstrahl in der Regel vor dem Objektiv, beispielsweise durch
- 30 einen dichroitischen Strahlteiler vereinigt werden, ist das optische Bauteil vorzugsweise vor dem Strahlvereiniger im Strahlengang des Stimulationslichtstrahls angeordnet.

Als optisches Bauteil ist beispielsweise eine Verzögerungsplatte, die als Phasenverzögerungsplatte ausgeführt ist, verwendbar. In der Praxis weisen Phasenverzögerungsplatten aufgrund von Fertigungstoleranzen Abweichungen von der geometrischen Idealform auf. Beispielsweise werden

- 5 die Radien einer $\lambda/2$ -Platte, wie sie in der bereits erwähnten Veröffentlichung (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 97, p. 8206-8210, 2000) verwendet werden, nicht mit den nominellen Radien übereinstimmen. Um dennoch die gewünschte Wellenfront in der Pupille zu erreichen, wird erfindungsgemäß die Größe des Abbildes des optischen Bauteils in der Pupille angepasst.
- 10 In einer bevorzugten Ausgestaltungsform weist die Optik, die das optische Bauteil in die Pupille des Objektivs abbildet, verschiebbare Fokussiermittel, wie beispielsweise Linsen oder Hohlspiegel, auf. In einer anderen Variante ist das Bauteil selbst vorzugsweise entlang der optischen Achse verschiebbar angeordnet. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsform weist die
- 15 Optik verschiebbare Fokussiermittel auf und das Bauteil selbst kann vorzugsweise entlang der optischen Achse verschiebbar angeordnet sein. Zum Verschieben der Optik bzw. des optischen Bauteils ist vorteilhafterweise ein motorischer Antrieb vorgesehen. Das Verschieben der Fokussiermittel und/oder des optischen Bauteils erfolgt vorzugsweise derart, dass das Abbild
- 20 des optischen Bauteils stets in der Pupille des Objektivs verbleibt und dass der Anregungslichtstrahl bzw. der Stimulationslichtstrahl das Objektiv als paralleles Lichtbündel beleuchtet.
- 25 In einer anderen bevorzugten Variante ist die Optik als vorzugsweise motorisch einstellbare Variooptik ausgebildet. Diese kann einerseits zum Justieren des Systems oder andererseits zur Anpassung der Größe des Abbildes des optischen Bauteils auf verschiedene Pupillendurchmesser, beispielsweise unterschiedlicher Objektive, verwendet werden.
- 30 Die Variooptik ist vorzugsweise so ausgestaltet, dass bei einer Veränderung ihrer Brennweite der Brennpunkt, der sich auf dem in die Pupille abzubildenden Bauteils gegenüberliegenden Seite der Variooptik befindet, ortsfest bleibt. In einer ganz bevorzugten Ausgestaltung der Variooptik bleiben bei einer Brennweitenveränderung beide Brennpunkte der Variooptik ortsfest.

Anstelle der bereits erwähnten Möglichkeiten zum Einstellen der Größe des Abbildes des optischen Bauteils kann auch vorgesehen sein, die Optik gegen eine Optik mit anderen optischen Eigenschaften auszutauschen. Hierzu ist vorzugsweise ein als Revolver oder Schiebeschlitten ausgebildetes

- 5 Vorratsmittel vorgesehen, in dem unterschiedliche Optiken bevoratet sind, die vorzugsweise durch einfaches Drehen bzw. Schieben des Vorratsmittels in den Strahlengang des Anregungs- bzw. Stimulationslichtstrahls eingebracht werden können. Vorzugsweise ist das Vorratsmittel motorisch angetrieben.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsvariante erfolgt die 10 Einstellung der Größe des Abbildes des optischen Bauteils automatisch. Vorzugsweise ist ein Mittel zum automatischen Erkennen des in den Strahlengang eingebrachten Objektivs vorgesehen, das es einem Steuerrechner ermöglicht, die für dieses Objektiv optimale, gegebenenfalls vorgespeicherte Einstellung vorzunehmen. Vorzugsweise erfolgt die 15 Einstellung der Größe des Abbildes des optischen Bauteils in Abhängigkeit vom Durchmesser der Pupille des gewählten Objektivs.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsvariante ist das Rastermikroskop als konfokales oder als doppelkonfokales Rastermikroskop ausgebildet.

- 20 Die Pupillenebene ist eine Fourierebene zur Fokusebene des Objektivs und in einer bevorzugten Variante erzeugt die Optik eine weitere Fourierebene, in der das optische Bauteil angeordnet ist.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

- 25 Fig. 1 ein erfindungsgemäßes Rastermikroskop,
Fig. 2 eine schematische Darstellung der Abbildung des optischen Bauteils in die Pupille des Objektivs,

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Rastermikroskop, das als konfokales Rastermikroskop ausgebildet ist. Das Rastermikroskop beinhaltet eine erste 30 Lichtquelle 1, die einen Anregungslichtstrahl 3 zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs einer Probe 5 emittiert. Der Anregungslichtstrahl 3 wird

mit der Optik 7 auf die Beleuchtungslochblende 9 fokussiert, passiert diese und wird anschließend von der weiteren Optik 11 kollimiert. Das Rastermikroskop umfasst eine weitere Lichtquelle 13, die einen Stimulationslichtstrahl 15 erzeugt, der mit der Linse 17 auf die 5 Stimulationslochblende 19 fokussiert wird. Der durch die Stimulationslochblende 19 tretende Stimulationslichtstrahl 15 wird von der weiteren Linse 21 kollimiert und durchläuft anschließend ein optisches Bauteil 23 zur Beeinflussung der Form des Fokus des Stimulationslichtstrahls 15. Das optische Bauteil 23 besteht aus einem Substrat 25, auf das eine 10 PhasenverzögerungsPlatte 27, die als $\lambda/2$ - Platte ausgestaltet ist und die einen kleineren Durchmesser als den Durchmesser des Stimulationslichtstrahls 15 aufweist, angebracht ist. Eine Variooptik 29 fokussiert den durch das optische Bauteil 23 tretende Stimulationslichtstrahl 15 zu einem Fokus 31. Die Variooptik 29 ist so ausgestaltet, dass der Ort des 15 Fokus 31 konstant bleibt, so dass gegebenenfalls nur das optische Bauteil nachjustiert werden muss. Die Variooptik 29 ist bei diesem Rastermikroskop derart ausgebildet, dass die Lage ihrer vorderen Brennebene, in der sich der Fokus 31 befindet, und die Lage der hinteren Brennebene, in der das optische Bauteil angeordnet ist, stets konstant bleiben, um ein Nachjustieren des 20 optischen Bauteils in axialer Richtung zu vermeiden. Der Anregungslichtstrahl 3 und der Stimulationslichtstrahl 15 werden mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers 33 vereinigt und über den Hauptstrahlteiler 35 zu einer Strahlablenkeinrichtung 37, die einen kardanisch aufgehängten Scanspiegel 39 beinhaltet, gelenkt. Die Strahlablenkeinrichtung 37 führt den 25 Anregungslichtstrahl 3 und den Stimulationslichtstrahl 15 gemeinsam durch die Scanoptik 41, die Tubusoptik 43 und durch das Objektiv 45 über bzw. durch die Probe. Im Probenbereich überlappen die Fokusse des Anregungslichtstrahls und des Stimulationslichtstrahls zur Erzielung des STED-Effektes teilweise. Das von der Probe ausgehende Detektionslicht 47 30 gelangt durch das Objektiv 45, die Tubusoptik 43, die Scanoptik 41 und über die Strahlablenkeinrichtung 37 zurück zum Hauptstrahlteiler 35, passiert diesen und trifft nach Passieren der Detektionslochblende 49 auf den als Photomultiplier 51 ausgebildeten Detektor 53. Zum Fokussieren des

Dektionslichts 47 auf die Dektionslochblende 49 ist eine Fokussier-Optik 55 vorgesehen. Die zwischen dem optischen Bauteil 23 und dem Fokus 31 angeordnete Variooptik 29 und die zwischen dem Fokus 31 und dem dichroitischen Strahlteiler 33 angeordnete Linse 57 bilden gemeinsam mit der 5 Scanoptik 41 und der Tubus-Optik 43 eine Optik, die das optische Bauteil 23 in die Pupille 59 des Objektivs 45 abbildet. Mit Hilfe der Variooptik 29 kann die Größe des Abbildes des optischen Bauteils eingestellt werden. Dem Fachmann ist hierbei klar, dass im Normalbetrieb des Rastermikroskops in der Pupille 59 des Objektivs 45 kein reales sichtbares Abbild des optischen 10 Bauteils existiert.

Fig. 2 illustriert, wie die aus der Variooptik 29 der Linse 57, der Scanoptik 41 und der Tubus-Optik 43 gebildete Optik das optische Bauteil in die Pupille des Objektivs abbildet. Hierbei handelt es sich um eine schematische Illustration eines Strahlenganges (durchgezogene Linien), der im Normalbetrieb des 15 Rastermikroskops nicht vorhanden ist. Vielmehr handelt es sich um einen Fourier-Strahlengang, wie er beispielsweise auch zur Illustration der Köhler'schen Beleuchtung fachüblicherweise eingezeichnet wird.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und 20 Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

- 1 Lichtquelle
- 3 Anregungslichtstrahl
- 5 5 Probe
- 7 Optik
- 9 Beleuchtungslochblende
- 11 weitere Optik
- 13 weitere Lichtquelle
- 10 15 Stimulationslichtstrahl
- 17 Linse
- 19 Stimulationslochblende
- 21 Linse
- 23 optisches Bauteil
- 15 25 Substrat
- 27 Phasenverzögerungsplatte
- 29 Variooptik
- 31 Fokus
- 33 Strahlteilers
- 20 35 Hauptstrahlteiler
- 37 Strahlablenkeinrichtung
- 39 Scanspiegel
- 41 Scanoptik
- 43 Tubusoptik
- 25 45 Objektiv
- 47 Detektionslicht

- 49 Detektionslochblende
- 51 Photomultiplier
- 53 Detektor
- 55 Fokussieroptik
- 5 57 Linse
- 59 Pupille

Patentansprüche

1. Rastermikroskop mit einem Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs, mit einem Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, mit zumindest einem Objektiv zum Fokussieren des Anregungslichtstrahls und des Stimulationslichtstrahls und mit einem optischen Bauteil zur Beeinflussung der Form des Fokus des Anregungslichtstrahls und/oder des Stimulationslichtstrahls, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Optik zum Abbilden des optischen Bauteils in die Pupille des Objektivs vorgesehen ist, wobei die Größe des Abbildes des optischen Bauteils einstellbar ist.
2. Rastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik verschiebbare Fokussiermittel umfasst.
3. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil verschiebbar angeordnet ist.
4. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik und/oder das optische Bauteil motorisch verschiebbar sind.
5. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik eine – vorzugsweise motorisch einstellbare - Variooptik umfasst.

6. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik austauschbar ist.
7. Rastermikroskop nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Vorratsmittel vorgesehen ist, das Optiken unterschiedlicher optischer Eigenschaften bevatrat.
5
8. Rastermikroskop nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorratsmittel einen Revolver oder einen Schiebeschlitten umfasst.
9. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 7 oder 8,
10 dadurch gekennzeichnet, dass das Vorratsmittel motorisch angetrieben ist.
10. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstellung der Größe des Abbildes des optischen Bauteils automatisch erfolgt.
11. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
15 dadurch gekennzeichnet, dass die Einstellung der Größe der Abbildes des optischen Bauteils in Abhängigkeit von dem Durchmesser der Pupille des Objektivs erfolgt.
12. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil eine
20 Phasenverzögerungsplatte umfasst.
13. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Phasenverzögerungsplatte eine $\lambda/2$ -Platte ist.
14. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Phasenverzögerungsplatte lokal in verschiedenen
25 Bereichen unterschiedliche Phasenverzögerungen bewirkt.
15. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil ausschließlich auf den Stimulationslichtstrahl wirkt.

16. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastermikroskop ein konfokales Rastermikroskop oder ein doppelkonfokales Rastermikroskop ist.

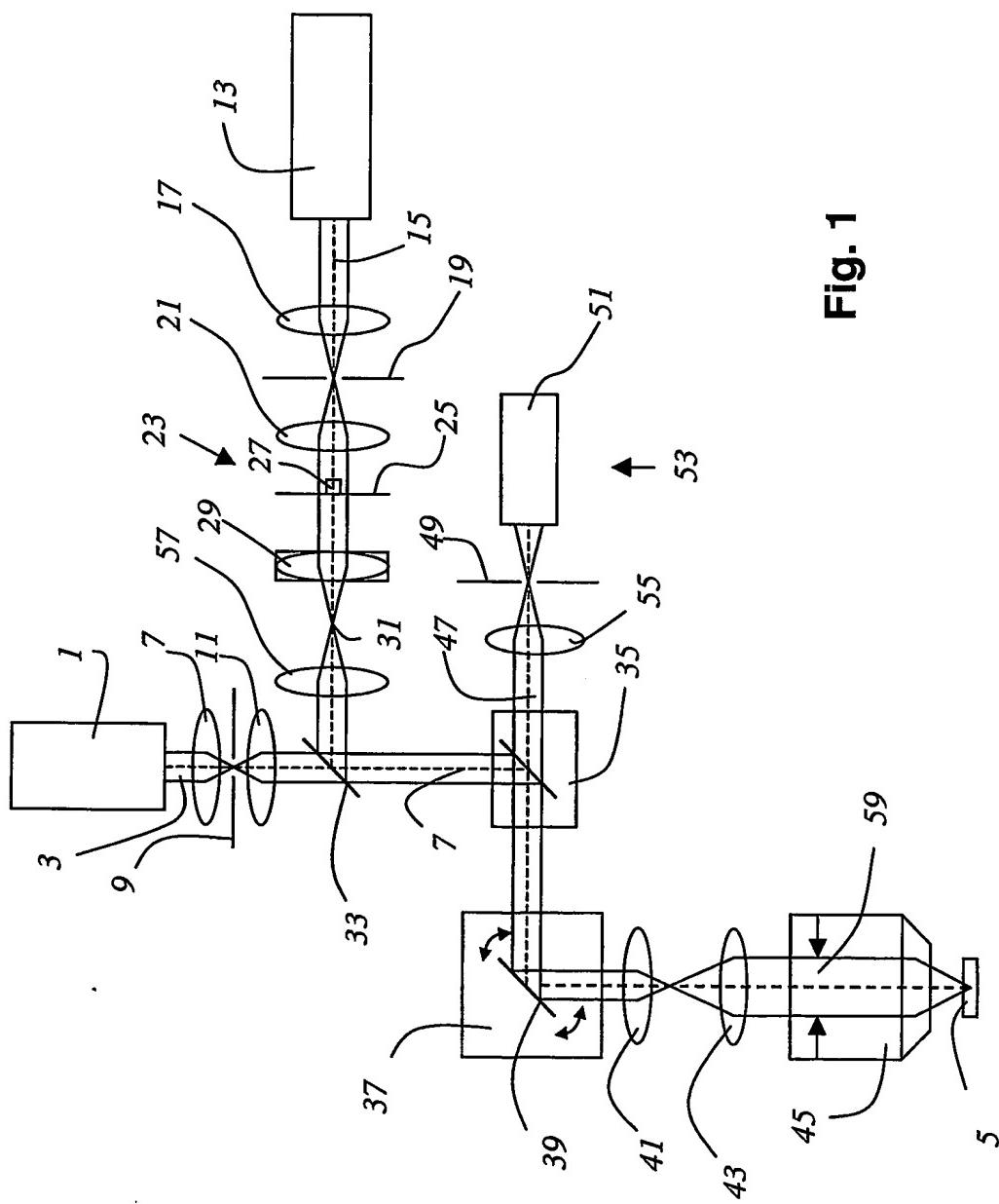
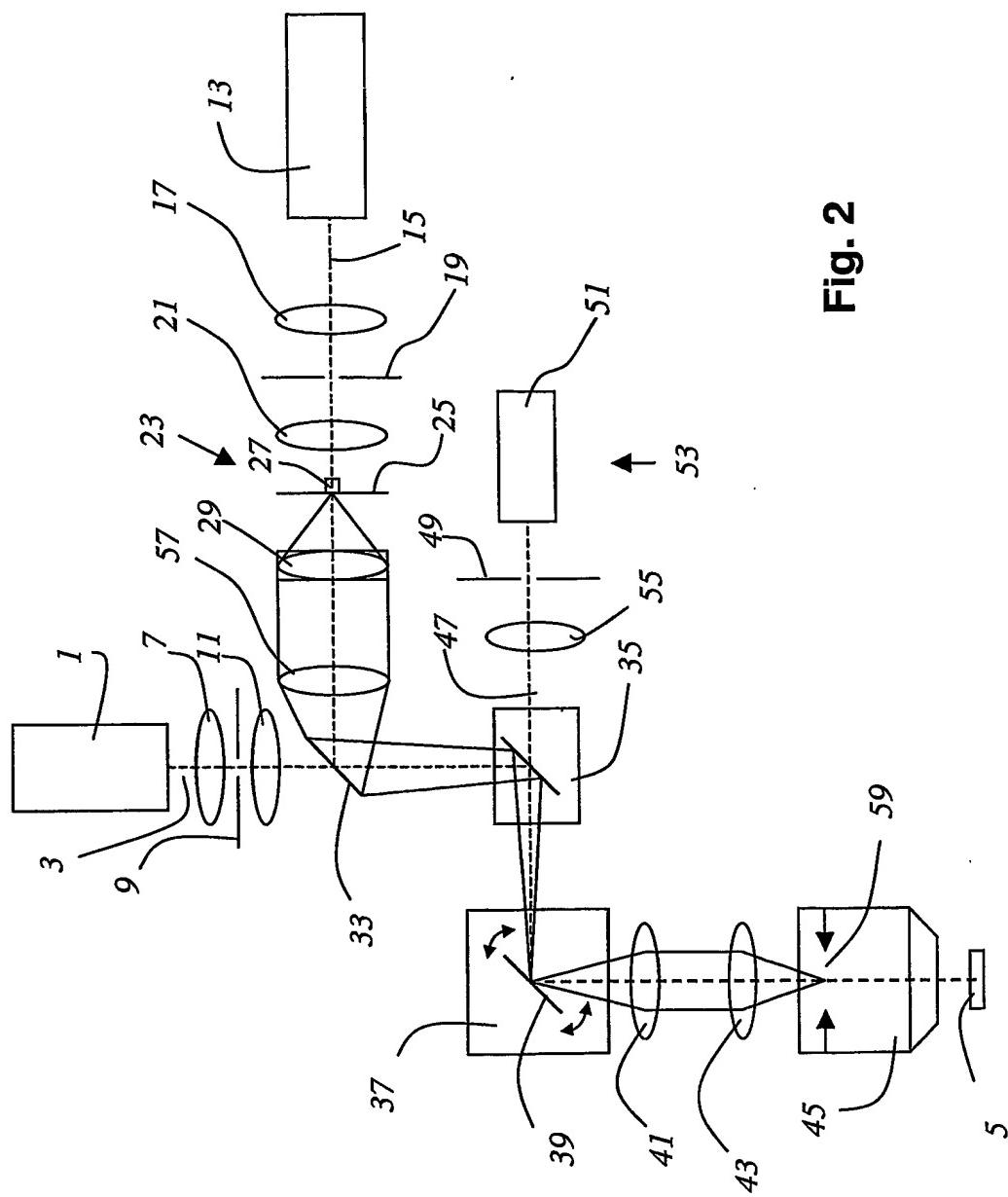


Fig. 1

**Fig. 2**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/051877

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>M. DYBA, S.W. HELL: "Focal Spots of Size Lamda/23 Open Far-Field Fluorescence Microscopy at 33nm Axial Resolution" PHYSICAL REVIEW LETTERS, vol. 88, no. 16, 22 April 2002 (2002-04-22), pages 163901-1-163901-4, XP002305573 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-16

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

15 November 2004

Date of mailing of the International search report

29/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Windecker, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/051877

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	T.A. KLAR, E. ENGEL, S. W. HELL: "Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes" PHYSICAL REVIEW E, vol. 64, no. 066613, 26 November 2001 (2001-11-26), pages 066613-1-066613.9, XP002305574 cited in the application the whole document -----	1-16
Y	US 5 731 588 A (HELL STEFAN ET AL) 24 March 1998 (1998-03-24) figures column 5, line 66 - column 8, line 31 -----	1-16
Y	US 3 437 395 A (ROSENBERGER HAROLD E ET AL) 8 April 1969 (1969-04-08) figure 1 column 5, line 1 - line 66 column 11, line 45 - column 12, line 23 -----	1-16
A	US 2002/109913 A1 (HELL STEFAN W ET AL) 15 August 2002 (2002-08-15) figures 1,7 paragraphs '0021!, '0022! paragraphs '0038!, '0039! paragraph '0045! -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational Application No
PCT/EP2004/051877

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5731588	A 24-03-1998	DE 4416558 A1		03-08-1995
		AT 204086 T		15-08-2001
		WO 9521393 A2		10-08-1995
		EP 0801759 A2		22-10-1997
US 3437395	A 08-04-1969	NONE		
US 2002109913	A1 15-08-2002	DE 10107095 A1		29-08-2002
		GB 2372897 A ,B		04-09-2002
		JP 2002303798 A		18-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/051877

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	M. DYBA, S.W. HELL: "Focal Spots of Size Lamda/23 Open Far-Field Fluorescence Microscopy at 33nm Axial Resolution" PHYSICAL REVIEW LETTERS, Bd. 88, Nr. 16, 22. April 2002 (2002-04-22), Seiten 163901-1-163901-4, XP002305573 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/-	1-16

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15. November 2004

29/11/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Windecker, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/051877

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	T.A. KLAR, E. ENGEL, S. W. HELL: "Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes" PHYSICAL REVIEW E, Bd. 64, Nr. 066613, 26. November 2001 (2001-11-26), Seiten 066613-1-066613.9, XP002305574 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-16
Y	US 5 731 588 A (HELL STEFAN ET AL) 24. März 1998 (1998-03-24) Abbildungen Spalte 5, Zeile 66 – Spalte 8, Zeile 31 -----	1-16
Y	US 3 437 395 A (ROSENBERGER HAROLD E ET AL) 8. April 1969 (1969-04-08) Abbildung 1 Spalte 5, Zeile 1 – Zeile 66 Spalte 11, Zeile 45 – Spalte 12, Zeile 23 -----	1-16
A	US 2002/109913 A1 (HELL STEFAN W ET AL) 15. August 2002 (2002-08-15) Abbildungen 1,7 Absätze '0021!, '0022! Absätze '0038!, '0039! Absatz '0045! -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/051877

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5731588	A 24-03-1998	DE 4416558 A1 AT 204086 T WO 9521393 A2 EP 0801759 A2	03-08-1995 15-08-2001 10-08-1995 22-10-1997
US 3437395	A 08-04-1969	KEINE	
US 2002109913	A1 15-08-2002	DE 10107095 A1 GB 2372897 A ,B JP 2002303798 A	29-08-2002 04-09-2002 18-10-2002